

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EAP. DE ODONTOLOGÍA

**Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico
de Rosmarinus officinalis (romero) sobre cultivos de
bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa
periodontal**

TESIS

Para obtener el Título de Cirujano Dentista

AUTOR

Isabel de María San Román Suárez

ASESOR

Hilda Moromi Nakata

Lima – Perú

2013

JURADO DE SUSTENTACIÓN:

Presidente : Mg. Blg°. César Augusto Bonilla Ferreyra
Miembro : C.D. Luis Alberto Benito Germán Santa Cruz
Miembro Asesor : Blg°. Elba Estefanía Martínez Cadillo

A mi madre, cuya presencia en mi vida es constante,
sin el cual nunca hubiera experimentado lo que tengo en la vida,
siempre amable, generosa, firme, estricta cuando fue necesario,
que Dios siempre la tenga en su gloria.

A mi padre y hermanos, por todo su amor,
comprensión, esfuerzo y apoyo incondicional
en gran parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Blg°. Elba Estefanía Martínez Cadillo, Profesora de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, asesora de la presente tesis. Por su constante apoyo, orientación y consejo.

Al Q.F. Américo Castro, Profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por su colaboración y orientación durante la elaboración del extracto y en la realización de los análisis cualitativos del extracto.

Al Mg. Blg°. César Augusto Bonilla Ferreyra, Profesor de bioquímica de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su acertada orientación en la realización de este trabajo.

Al C.D. Luis Alberto Benito Germán Santa Cruz, Profesor de Cirugía bucomaxilofacial de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su ayuda y orientación a lo largo de la elaboración del presente estudio

A la C.D. Teresa Evaristo, por su acertada guía durante el proceso de elaboración de este trabajo.

Al personal de laboratorio de microbiología de la facultad de odontología de la UNMSM, por su colaboración y paciencia durante la ejecución del presente proyecto.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	9
II.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
	2.1 Área problema.....	10
	2.2 Delimitación del área problema.....	11
	2.3 Formulación del problema.....	12
	2.4 Objetivos de la investigación.....	12
	2.4.1 General.....	12
	2.4.2 Específicos.....	13
	2.5 Justificación.....	13
	2.6 Limitaciones.....	14
III.	MARCO TEÓRICO.....	15
	3.1 Antecedentes.....	15
	3.2 Bases teóricas.....	22
	3.2.1 Enfermedad periodontal.....	22
	3.2.1.1 Clasificación de la enfermedad periodontal.....	23
	3.2.1.2 Periodontitis crónica.....	25
	3.2.1.3 Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis crónica.....	29
	3.2.1.4 Patógenos asociados a periodontitis crónica:.....	31
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	31
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	32
	<i>Tanarella forsythensis</i>	33
	<i>Prevotella Spp</i>	34

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	34
3.2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero).....	34
3.2.2.1 Historia.....	34
3.2.2.2 Clasificación sistemática.....	35
3.2.2.3 Distribución geográfica.....	36
3.2.2.4 Descripción general.....	36
3.2.2.5 Composición química.....	37
3.2.2.6 Propiedades del romero.....	38
3.2.2.7 Mecanismo de acción.....	40
3.2.2.8 Reacciones adversas.....	40
3.2.2.9 Uso del romero en la medicina.....	41
3.2.3 Clorhexidina.....	41
3.2.3.1 Historia.....	41
3.2.3.2 Características.....	43
3.2.3.3 Mecanismos de acción.....	43
3.2.3.4 Espectro de acción.....	44
3.2.3.5 Farmacocinética.....	44
3.2.3.6 Concentración.....	45
3.2.3.7 Indicaciones.....	45
3.2.3.8 Efectos adversos.....	46
3.3 Definición de términos básicos.....	47
3.4 Hipótesis y variables	48
3.5 Operacionalización de variables.....	49

IV.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	50
4.1	Tipo de estudio.....	50
4.2	Población y muestra.....	50
4.3	Recursos y materiales.....	51
4.4	Procedimiento y técnica	53
4.5	Procesamiento de datos.....	57
V.	RESULTADOS.....	58
VI.	DISCUSION.....	61
VII.	CONCLUSIONES.....	64
VIII.	RECOMENDACIONES.....	65
IX.	RESUMEN.....	66
X.	BIBLIOGRAFIA.....	68
XI.	ANEXOS.....	76
10.1	Cuadro de consistencia.....	76
10.2	Instrumentos de recolección de datos.....	78
10.3	Fotografías.....	82

LISTA DE CUADROS Y GRAFICOS

Cuadro 1. Composición química del “romero”	37
Cuadro 2. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de <i>R. officinalis</i> a diferentes concentraciones.....	58
Cuadro 3. Diferencias entre la actividad antimicrobiana promedio del extracto etanólico de <i>R. officinalis</i> y las soluciones de control.....	59
Grafico 1. Estructura química de clorhexidina.....	43
Grafico 2. Grafico 2. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de <i>R. officinalis</i> frente cultivos de bacterias anaerobias de bolsa periodontal.....	60

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales desde tiempos antiguos han sido consideradas como el primer recurso terapéutico para tratamientos o manutención de la salud, como medicina casera. Desde entonces estos conocimientos han evolucionado y las plantas han pasado a constituir importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos. Estudiando su actividad en el organismo e identificando su carácter terapéutico se podrá avalar los usos que la medicina popular les atribuye.

El “romero” es un arbusto que fue introducido a América por los españoles en el siglo XVI. También fueron transmitidos los conocimientos sobre sus propiedades medicinales como el que las hojas mascadas y mezcladas con sal curaban heridas. Actualmente a esta planta se le atribuyen propiedades medicinales; antiespasmódico, diurético, tónico cerebral, frotaciones, etc. Tiene poco uso en el área de la salud oral, por ello desarrollaremos una posible aplicación en la salud bucal.

La condición de Salud Bucal en el Perú, atraviesa una situación crítica debido a la alta prevalencia de enfermedades odontoestomatológicas, tenemos así que la prevalencia de la enfermedad periodontal es de un 85 %, constituyendo un problema de salud pública. Teniendo en cuenta que nuestra población necesita alternativas de costos reducidos y a la vez un beneficio en el tratamiento de dichas afecciones, lo que haría accesible a las clases más populares. Lo que ha motivado la realización de esta investigación, dirigida a comprobar el efecto antibacteriano del romero.

El presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto antibacteriano “*in vitro*” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre la flora bacteriana de bolsa periodontal.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 ÁREA PROBLEMA

El ser humano desde tiempos remotos ha usado a las plantas para satisfacer sus necesidades y una de ellas es su salud. Mediante el ensayo error, a través del tiempo llego a determinar las propiedades curativas de algunas plantas. Estos conocimientos fueron trasmitidos a través del tiempo y espacio a las generaciones actuales.

La medicina tradicional peruana, herencia de tiempos precolombinos, sigue siendo la primera instancia de consulta y tratamiento en gran parte de nuestro país. En ella las plantas medicinales ocupan un rol muy importante, con una variada flora de aproximadamente 80,000 especies.¹

Las plantas medicinales son usadas en la odontología de dos maneras: una mediante la información que la medicina tradicional provee y otra bajo la forma científica mediante preparados tales como pasta dental, pasta tópica, enjuagues bucales, colutorios, etc... para el tratamiento de gingivitis, aftas, odontalgias, procesos inflamatorios; como fungicidas y antibacterianos.²

Las enfermedades periodontales son altamente prevalentes, por ejemplo la periodontitis crónica se inicia y es mantenida por la presencia de placa microbiana, el cual aloja diversos microorganismos encargados de desencadenar una destrucción del tejido periodontal. El tratamiento consiste básicamente en la remoción mecánica de la placa dental supragingival y subgingival, además del uso de agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, importante como coadyuvante en la primera fase de la terapia

periodontal; sin embargo, se plantea el desafío de buscar nuevas alternativas en agentes antimicrobianos y una disminución de las reacciones adversas que estos presentan.

La planta *Rosmarinus officinalis* L. conocida usualmente como romero, es conocida desde la antigüedad por sus usos medicinales, estudios recientes le dan propiedades antimicrobianas y antioxidantes.^{3,11,12,13,28}

2.2 DELIMITACION DEL AREA PROBLEMA

El “romero” es un arbusto perenne aromático, perteneciente a la familia Labiatae, caracterizada por tener aproximadamente 1.5 metros de altura, los tallos jóvenes que se vuelven leñosos al madurar, presenta pequeñas flores agrupadas en densas ramas terminales⁴. Tiene propiedades analgésicas, espasmolítico, antiinflamatorio, antifúngico y posible propiedad antineoplásica.^{5, 6} El “romero” es una especie vegetal común en la península Ibérica y, en general, en toda la cuenca mediterránea⁷. Llega al Perú en el siglo XVI. En el Perú crece en la costa, sierra y la selva hasta los 3500 msnm⁸.

Las enfermedades periodontales representan infecciones mixtas de los tejidos periodontales, causadas principalmente por bacterias anaerobias gramnegativas⁹. La profundización del surco gingival que se produce durante estas infecciones coincide con una proliferación bacteriana importante, desafiando al sistema inmunitario, generando una respuesta local y una respuesta sistémica del huésped¹⁰.

En investigaciones *in vitro* con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) ha demostrado tener actividad antibacteriana frente a bacterias de la cavidad oral como: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Streptococcus mutans*, y *Streptococcus sobrinus*¹¹. También el extracto de *R.officinalis* a demostrado actividad antibacteriana contra *S. mutans*, *S. aureus*, *S. casei*¹² y en *Streptococcus mitis* estándar de ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Estreptococcus sobrinus* ATCC 27609 y *Lactobacillus casei*¹³

El presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre flora bacterias de bolsa periodontal.

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal?

2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.4.1 Objetivo general

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal.

2.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a una concentración de 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal.
- Comparar la actividad antibacteriana de las tres sustancias de experimentación, mediante la medida del diámetro de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *R. officinalis* a diferentes concentraciones, sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal.

2.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las enfermedades periodontales tienen una prevalencia de un 85 %, constituyendo un problema de salud pública en el Perú.¹⁴ su tratamiento es apoyado por el uso de antisépticos tipo colutorio que tienen una probada actividad antimicrobiana contra las bacterias de la cavidad oral, pero también han manifestado efectos secundarios adversos, no satisfaciendo completamente los requerimientos para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Las plantas medicinales son consideradas importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos que se constituyen en precursores para la síntesis de fármacos. Son también considerados como recursos terapéuticos para el tratamiento o manutención de la salud como medicina casera, principalmente en naciones en vías de desarrollo.

Debido a que *Rosmarinus officinalis* ha demostrado tener actividad antibacteriana en estudios realizados en bacterias del tracto gastrointestinal,^{15,16,17} de la cavidad oral^{11,12,18}, etc. Encontrándose pocas investigaciones en bacterias de bolsa periodontal, es necesario determinar su carácter bactericida o bacteriostático para las bacterias que afectan al tejido periodontal.

En el presente estudio se evaluará la actividad antibacteriana del extracto de *R. officinalis* frente a bacterias periodontopatógenas de la cavidad oral; su desarrollo permitirá encontrar otras alternativas para el control del biofilm dental en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Además encontrar una forma de disminuir los efectos secundarios de los antisépticos orales en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

2.6 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

De la revisión realizada se observa que en el país no existen investigaciones sistematizadas de la actividad fitofarmacológica de la planta medicinal *Rosmarinus officinalis* (romero) en el campo odontológico.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Teixeira L. (2012). Determinó la acción antimicrobiana *in vivo* del extracto de *R. officinalis* Linn, en bacterias orales presentes en la biopelícula. Realizó un estudio con 11 voluntarios, quienes realizaron un enjuague bucal con las siguientes soluciones: placebo; clorhexidina al 0,12 (control positivo) y extracto de *R. officinalis* Linn, en 3 fases de 14 días cada uno. El índice de higiene oral simplificado se utilizó para determinar la acción de las soluciones en la biopelícula. Después del uso de clorhexidina, el 64 % de los voluntarios presento buena higiene y menos del 36 % limpieza regular, con una media de 1,16. Después de usar extracto de *R. officinalis* el 54 % presento buena higiene y 45 % limpieza regular, con una media de 1,3.¹⁹

Pinheiro M. y Col. (2012). Evaluaron la actividad bacteriostática y bactericida de tinturas hidroalcohólicas de *Rosmarinus officinalis*, *Calendula officinalis*, *Mikania glomerata*, demostrando su acción bacteriostática y bactericida a bajas concentraciones, sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. Entretanto la actividad antimicrobiana de clorhexidina fue superior a las tinturas.¹⁸

Dalirzani Z. y Col. (2011). Evaluaron el efecto antimicrobiano de diez extractos de hierbas (tomillo, menta, ajo, canela, manzanilla, árbol de té, clavo, hierbabuena, salvia y romero) en *Streptococcus mutans* cepa estándar ATCC-1683, comparado con clorhexidina. La sensibilidad antimicrobiana de los extractos se determinó por el método de difusión en disco estándar retirados a una hora de secar e incubados por 24 h en agar sangre. La media de la zona de inhibición el extracto etanólico de “romero” fue $(11,52 \pm 0,96)$ significativamente menor a clorhexidina (14.07 ± 1.70) .²⁰

Volção L. y Col. (2011). Evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* O157:H7 *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes*. El aceite esencial mostró mayor actividad antimicrobiana en *Enterococcus faecalis* Gram-positivo y *Enterobacter aerogenes* bacilo Gram-negativo. También mostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 a mayor concentración del aceite esencial.¹⁷

Mahmoudvand M. y Col. (2011). Evaluaron las propiedades insecticidas mediante la toxicidad fumigante de algunos aceites esenciales sobre las plagas de productos almacenados; los valores de Chemical concentration that kills 50% of a sample population (LC50) de *R.officinalis* en adultos de polillas de *P. interpunctella* después de 24 horas tuvo toxicidad fumigante de 0,93 $\mu\text{L L}^{-1}$ aire. La tendencia de la mortalidad de *P. interpunctella* aumentó después de 12 horas hasta en un 80 %.²¹

Castaño H. y Col. (2010). Evaluaron la actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. El aceite esencial exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas. El extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*.¹⁶

Battagin J. (2010). Evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de extractos vegetales de *Rosmarinus officinalis* Linn (romero), *Camelia sinensis* (té verde) y *Ilex paraguariensis* (mate) sobre la actividad glucosiltransferasa y sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. El extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (romero) a concentraciones por encima de 4mg/ml mostró una inhibición significativa de la actividad de GTF (50 – 75 %). los extractos ensayados no fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* (absorbancia > 0.05)²².

Hussain A. y Col (2010). Evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* por el método de difusión en disco (15 µL) contra cepas de *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *B. subtilis* (NCTC 10400), *Bacillus pumilis* (tipo salvaje), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 1662), *Salmonella Poona* (NCTC 4840), *Escherichia coli* (ATCC 8739) y ampicilin resistentes *Escherichia coli* (NCTC 10418). Encontrando zonas de inhibición de 22.0, 24.2, 23.0, 18.0, 17.0, 17.5, 14.3, 12.8 mm respectivamente. La actividad de ciprofloxacino (25 µg/disco) siempre fue en un 20 % a 50 % mayor que el del aceite esencial.²³

Rojas J. y Col. (2010). Evaluaron la actividad anti *Tripanosoma cruzi* en epimastigotes cultivados en medio LIT, incubados por 48 horas a 37 °C en un incubadora humidificado con CO₂ al 5 %. El cristal violeta se utilizó como control positivo. El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) exhibió moderada actividad inhibitoria, con CI₅₀ de 120,23 a 346,74 µg/mL.²⁴

Arévalo Y. y Col. (2009). Evaluaron la actividad antileishmanial de trece aceites esenciales de diferentes familias de plantas colombianas sobre los promastigotes de *L. braziliensis*. Tuvo como control positivo a la pentamidina con una concentración efectiva

(1,53 +/- 0,01 µg/mL). De los aceites esenciales *R. officinalis* mostró el mayor efecto antiparasitario sobre los promastigotes a una concentración efectiva (17,4 +/- 0,43 µg/mL).²⁵

Monroy A. y Col. (2009). Evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis in vitro* contra *Listeria monocitogenes*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, donde encontró una inhibición del 90 % de las UFC, al utilizar una concentración mínima inhibitoria de 0.8 mg/ml, 1.2 mg/ml y 1.2 mg/ml respectivamente. También evaluó *in situ* utilizándolos en un batido cárnico (1.0%, 0.5 %) donde mediante un conteo encontró la disminución del número de mesófilos y coniformes totales.²⁶

Ardila M. y Col. (2009). Evaluaron la actividad antibacteriana frente a *Clostridium perfringens* (cepa ATCC: 13124), por el método de Kirby Bauer en agar SPS utilizando la vancomicina (30 µg/ml) como control. El extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) fue disuelto en hexano-acetona, esta solución presentó un diámetro de inhibición (14,4 mm) cercano al de la vancomicina (14,5 mm)²⁷

Barni M. y Col. (2009). Evaluaron la eficiencia antibacteriana de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* que contiene altas concentraciones de polifenoles antioxidantes, en dos modelos de infección en piel de ratón: superficial y subcutáneo contra *Staphylococcus aureus*. Los resultados evidenciaron la acción bacteriostática del extracto de *R. officinalis* que contiene un 2,3% de polifenoles activos y la acción bactericida del extracto que contiene un 4,6% de polifenoles activos contra la bacteria patógena *S. aureus* en los dos modelos de infección en piel de ratón.²⁸

Alves M. y Col. (2008). Estudiaron la actividad antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* sobre especies de microorganismos predominantes en el biofilm supragingival. Las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 9811), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609) y *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) demostró ser susceptible a la acción del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* observándose halos de inhibición de 11 a 20 mm. El extracto no presentó actividad antimicrobiana sobre la cepa de *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557). Comparado con el control positivo, clorhexidina 0,12 %, se observó que también inhibe el crecimiento bacteriano en todas cepas analizadas con halos de inhibición que varían de 11 a 18 mm.¹²

Silva M. y Col. (2008). Determinaron la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* in vitro usando el método de difusión en pocillos en agar Müller Hinton, frente a cepas estándar de: *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 y *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Se observó halos de inhibición del crecimiento bacteriano de 11 a 18 mm. a excepción de *Streptococcus mitis* ATCC 98811. Clorhexidina al 0,12 % presentó halos de inhibición de 10 a 24 mm para todas las cepas.¹³

Valones M. y Co. (2008). Determinaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* a través del método de difusión en agar en medio BHI, utilizando las bacterias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 9811 y *Lactobacillus casei* ATCC 7469. El extracto puro de *Rosmarinus officinalis* mostró halos de inhibición para *S. mutans* y *S. aureus* de 16 mm y para *L. casei* de 17

mm en una dilución de 1:8 fueron observados halos de 14, 13 y 12mm respectivamente. Para clorexidina estos halos fueron de 14, 17 y 25 mm respectivamente²⁹.

Genena A. y Col. (2008). Evaluaron la actividad antioxidante, antibacteriana y anti fúngica del extracto de *R. officinalis*. Se usó una técnica para la obtención del extracto llamada: Extracción con fluidos supercríticos (SFE), técnica eficaz para la separación de compuestos activos de las hierbas. El extracto de *R. officinalis* mostro mayor actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus cereus* ATCC 11778) el extracto se hizo más eficiente con el paso tiempo de extracción (MIC 0.25 y 0.125 mg/ml respectivamente). También mostró un efecto contra las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) con un MIC \geq 1.0 mg/ml. El extracto obtenido en los primeros 60 minutos no presentó actividad antifúngica suficiente para inhibir el crecimiento de *C. albicans* (MIC > 2.0 mg/ml), pero el obtenido con un período de extracción creciente este llegó a presentar actividad (MIC= 0.5 mg/ml).³⁰

Hentz S. y Col. (2007). Evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro de aceite esencial de *R. officinalis* contra *Salmonella* sp. Usando como control positivo sulfametoxazol, norfloxacin, neomicina. El aceite esencial comercial de *Rosmarinus officinalis* sólo presenta actividad inhibitoria ante *Salmonella* sp. cuando es usada al 100 % de su concentracion.³¹

Cordeiro C. y Col. (2006). Desarrollaron un enjuague bucal que contenía extractos hidroalcohólicos de *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major*, *Tabebuia impetiginosa*, *Achillea millefolium* y *Nasturtium officinale*. La actividad antibacteriana in vitro se evaluó frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y

Pseudomonas aeruginosa. Todas las bacterias fueron inhibidas por los extractos del colutorio, la especie *S. aureus* y *B. subtilis* mostraron aparentemente mayor sensibilidad.¹⁵

Takarada K. y Col. (2004). Investigaron los efectos antibacterianos de distintos aceites esenciales sobre algunas bacterias periodontopatógenas y cariogénicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, y *Streptococcus sobrinus*. El aceite esencial de *R. officinalis* inhibió la capacidad de adherencia de *S. mutans*, además inhibió el crecimiento de las bacterias Gram-negativas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.¹¹

Nascimento G. y Col. (2000). Evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro de algunos extractos de plantas y fitoquímicos contra microorganismos antibióticos susceptibles y antibióticos resistentes como; levadura *Candida albicans*, cinco bacterias sensibles; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Proteus spp* y ocho bacterias resistentes a antibióticos aisladas del ambiente hospitalario; 2 muestras diferentes *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella spp*, *Proteus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para el extracto etanólico de *R. officinalis* se observó actividad antibiótica de un 33 % de inhibición de los microorganismos susceptibles y 0 % para los microorganismos resistentes.³²

3.2 BASES TEÓRICAS

3.2.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL

El periodonto es un conjunto de estructuras tisulares que constituyen una unidad de desarrollo, biológica y funcional. Conformado por la encía, el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal. La función principal del periodonto consiste insertar el diente al tejido óseo de los maxilares y en mantener la integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal.¹⁰

El término de enfermedad periodontal alude a procesos patológicos que alteran las estructuras del periodonto y estos procesos pueden reunirse en dos grandes grupos: la gingivitis y la periodontitis. Las gingivitis incluyen procesos que afectan la encía; es una inflamación de los tejidos blandos que rodean al diente sin extenderse al cemento el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Las periodontitis son procesos que comprometen todas las estructuras del periodonto y son una familia de patologías que difieren en su etiología, historia natural, progresión y respuesta al tratamiento.³⁴

La etiología de las periodontitis es multifactorial. En ellas intervienen los microorganismos y un hospedero susceptible. Los microorganismos actúan como factores etiológicos esenciales e iniciadores del proceso infeccioso; ellos son los productores de los factores de virulencia que modulan la respuesta inmune; la susceptibilidad del huésped a las EP es afectada por los factores de riesgo de tipo ambiental, sistémico, genético, entre otros.³⁵

3.2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Una convención realizada en el año 1999 recibió la tarea específica de revisar la clasificación de las enfermedades periodontales, en el Workshop on the Classification of Periodontal Diseases, 1999. La nueva clasificación resultante comprende ocho categorías principales:³³

- I. Enfermedades gingivales.
 - A. Enfermedades gingivales inducidas por el biofilm.
 - B. Enfermedades gingivales no inducidas por el biofilm.

- II. Periodontitis crónica.
 - Leve (pérdida de inserción clínica: 1 – 2 mm)
 - Moderada (3 – 4 mm de pérdida de inserción clínica)
 - Severa (\geq 5 mm de pérdida de inserción clínica)
 - A. Localizada (menos de 30 % de los sitios afectados)
 - B. Generalizada (más de 30 % de los sitios afectados)

- III. Periodontitis agresiva.
 - Leve (pérdida de inserción clínica: 1 – 2 mm)
 - Moderada (3 – 4 mm de pérdida de inserción clínica)
 - Severa (\geq 5 mm de pérdida de inserción clínica)
 - A. Localizada (menos de 30 % de los sitios afectados)
 - B. Generalizada (más de 30 % de los sitios afectados)

IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.

- A. Asociada con enfermedades hematológicas.
- B. Asociada con desordenes genéticos.
- C. Otras no específicas.

V. Enfermedades periodontales necrosantes.

- A. Gingivitis ulceronecrotizante (GUN)
- B. Periodontitis ulceronecrotizante (PUN)

VI. Abscesos del periodonto.

- A. Absceso gingival.
- B. Absceso periodontal.
- C. Absceso coronal.

VII. Periodontitis asociada con lesiones endodónticas.

VIII. Deformidades y afecciones de desarrollo o adquiridas.

- A. Factores relacionados al diente que modifican o predisponen a gingivitis o periodontitis asociada a biofilm.
- B. Deformidades y condiciones mucogigivales alrededor del diente.
- C. Deformidades y condiciones mucogingivales en rebordes alveolares.
- D. Trauma oclusal.

3.2.1.2 PERIODONTITIS CRÓNICA

Las enfermedades gingivales y periodontales aquejan al ser humano desde comienzos de la historia. Estudios paleontológicos indican que la enfermedad periodontal afectó a los primeros seres humanos de culturas tan distintas como el antiguo Egipto y la América precolombina.³⁶

Historia

La periodontitis crónica antes conocida como “periodontitis del adulto” o “periodontitis crónica del adulto”. Aunque la periodontitis crónica se observa más a menudo en adultos, puede aparecer en niños y adolescentes, ante la presencia de factores sistémicos o ambientales que pueden modificar la reacción del huésped a la acumulación crónica de placa. Esta observación sustentó el cambio de denominación, de periodontitis “del adulto”, que sugiere que la anomalía inducida por placa solo se observa en adultos, a una descripción más incluyente de periodontitis crónica, que puede surgir a cualquier edad.³⁶

A lo largo de la historia de la periodoncia se han sucedido clasificaciones de las enfermedades periodontales, la del año de 1989 en el *World Workshop in Clinical Periodontics* en Princeton (EEUU), Esta clasificación tenía un carácter marcadamente clínico que no satisfacía a todos. Es por ello que se han ido sucediendo distintas clasificaciones, de consenso, en los diferentes workshops europeos y estadounidenses, teniendo como luz a los conocimientos más actualizados sobre etiología, patogénesis y tratamiento de estas enfermedades.

En el World Workshop de 1989, se denominó periodontitis del adulto a aquel paciente que presentaba enfermedad periodontal a partir de los 35 años, con reabsorción ósea lenta y predominantemente horizontal. Unos años más tarde, en Europa se llega al consenso de otra nueva clasificación en el European Workshop de 1993, en el que la periodontitis del adulto está descrita como un factor primario, y no es hasta el World Workshop de 1999 que se sustituye por el nombre de periodontitis crónica ya que esta enfermedad puede ocurrir sobre un rango muy variable de edades y a pesar de su ritmo generalmente lento de progresión, algunos individuos presentaban periodos cortos de exacerbación.³⁷

Definición

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa que produce inflamación en los tejidos de soporte de los dientes, pérdida de inserción progresiva y reabsorción ósea del hueso alveolar de los maxilares, la formación de bolsas periodontales o la recesión gingival suele ser una secuela del proceso de la afección. Esta enfermedad se puede presentar a cualquier edad.³⁶

La periodontitis crónica se inicia como gingivitis durante la pubertad o poco después de ella, pero los síntomas como pérdida ósea y de inserción no se observan hasta más tarde. Aunque la periodontitis crónica se inicia y es mantenida por la presencia de placa microbiana, los mecanismos de defensa del huésped tienen un papel esencial en su patogenia y en la susceptibilidad intrínseca del paciente para esta enfermedad.¹⁰

Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud en un informe del 2007. En América central y América del sur, la prevalencia total de enfermedad periodontal grave varía entre 4 % y 19 %. En la Región estas variaciones son debidas, en parte, a diferencias metodológicas más que a variaciones geográficas. La enfermedad periodontal tiene factores de riesgo comunes para trastornos o afecciones no transmisibles, tales como tabaquismo, malnutrición, consumo excesivo de alcohol, estrés, diabetes mellitus y otros trastornos sistémicos.³⁴

Albandar y Rams, en el año 2002, muestra que la periodontitis crónica es la forma más frecuente de periodontitis, la prevalencia y severidad aumentan con la edad, y que las formas severas afectan únicamente a un pequeño porcentaje de la población.³⁸

En el Perú en un estudio realizado para determinar la prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y su consecuente necesidad de tratamiento en 263 varones entre 17 y 21 años. La prevalencia de los hallazgos fue como sigue: de cálculos dentarios fue de 77,4 %, de profundidad al sondaje (entre 4-5 mm) fue de 22,4 %, hemorragia al sondaje de 0,4%, pérdida de fijación entre 4-5 mm fue de 21,5 % y entre 6-8 mm fue de 1,1 %.³⁹

En México en un estudio realizado en 630 pacientes de ambos géneros de 30 años de edad a más. La prevalencia de la periodontitis crónica en este estudio fue del 67.2 %, la severidad o el promedio de pérdida de inserción por sujeto fue de 2.29 mm y la extensión de la enfermedad, el porcentaje de sitios afectados por sujeto fue del 57 %.⁴⁰

Patogénesis

Los procesos patogénicos de la enfermedad periodontal son principalmente el resultado de la respuesta del huésped a la destrucción tisular inducida por los microorganismos. Estos procesos destructivos se inician por las bacterias, pero se propagan mediante las células del huésped, de manera que, lo que provoca la destrucción tisular es la respuesta de este último, mediante la producción de enzimas que destruyen los tejidos.⁴¹

El modelo actual establece que las bacterias periodontopatógenas al ingresar desencadena una serie de respuestas en el hospedero. Una respuesta inmediata es el reclutamiento y migración de los PMNs, neutrófilos al sitio de infección periodontal. Si estas células inflamatorias son capaces de contener y eliminar los patógenos causales y sus productos (como el LPS o lipopolisacarido de las bacterias gran negativas) vía fagocitosis y mecanismos de eliminación intracelular, la enfermedad se limita a gingivitis. Si estos mecanismos fallan y los patógenos o sus productos penetran los tejidos del hospedero, la enfermedad se convierte en periodontitis. La producción de IL - 1 β , TNF- α y PGE₂ en respuesta al LPS bacteriano lleva a la reabsorción ósea a través de la activación, proliferación y diferenciación de los osteoclastos y clínicamente se establece con la formación de la bolsa periodontal y la pérdida de hueso alveolar.³⁶

Tratamiento

La Academia Americana de Periodoncia en el 2005 - 2006 aconsejó el seguimiento de una serie de pautas para el tratamiento de la periodontitis crónica:⁴²

1. Tratamiento mecánico: Raspado supra y subgingival.
2. Instrucciones de higiene oral.
3. Raspado y alisado radicular.
4. Reevaluación.
5. Cirugías:
 - Terapia resectiva: Cirugía a colgajo con o sin osteotomía, amputación radicular.
 - Terapia regenerativa.
 - Terapia mucogingival.
6. Estricto programa de mantenimiento.
7. Se puede optar por diagnóstico microbiológico y la prescripción de un antibiótico adecuado.

3.2.1.3 Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis crónica

Biopelícula

En cualquier parte de la naturaleza una biopelícula es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células irreversiblemente unidas a un sustrato o interfase y entre sí, embebidas en una matriz extracelular de sustancias polimerizadas por ellas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al grado de multiplicación celular y transcripción de genes.³³ La característica de las biopelículas es que resisten a los antimicrobianos locales y sistémicos, al estrés ambiental y a las defensas del hospedador.

Los microorganismos que causan las enfermedades periodontales residen en las biopelículas que existen sobre los dientes o sobre las superficies periodontales. La biopelícula provee un medio protector para la colonización de microorganismos y promueve las propiedades metabólicas que no sería posible si las especies existiesen en un estado platónico.¹⁰

Placa subgingival

La biopelícula subgingival está ubicada a nivel del espacio del surco gingival el cual se encuentra escasamente colonizado, sin embargo la cantidad y la diversidad de microorganismos aumenta con la evolución de la enfermedad. Con la acumulación y la maduración de la biopelícula supragingival, se producen cambios inflamatorios que modifican las relaciones anatómicas entre el margen gingival y la superficie dentaria, y el resultado es un nuevo ambiente ecológico, protegido por el medio bucal supragingival y con acceso al fluido gingival.³³

El desarrollo de la placa subgingival se lleva a cabo según el clásico esquema de colonización, sucesión y asociaciones microbianas de Socransky, describieron cinco complejos microbianos, las diferencias entre salud y enfermedad se basan en la asociación y en el predominio de dos complejos de gramnegativos. Ambos complejos están compuestos de especies consideradas como los agentes etiológicos más importantes de las enfermedades periodontales que son prevalentes en la película subgingival asociados con gingivitis y periodontitis.¹⁰

3.2.1.4 Patógenos asociados a periodontitis crónica:

En las muestras de placa subgingival humana se encuentran hasta 300 o 400 especies bacterianas, de todas ellas posiblemente 10 - 20 especies intervienen en la patogenia de la enfermedad periodontal destructiva⁴³

Estudios realizados describen la microflora más frecuente hallada en pacientes con periodontitis crónica como el encontrado por Mujica y col (2010), mediante el uso de reacciones individuales de PCR, en 67 pacientes con periodontitis crónica sin tratamiento periodontal previo; observo fragmentos específicos para *P. gingivalis* (31 %), *T. denticola* (58 %), *F. nucleatum* (90 %), *T. forsythia* (30 %) y *A. actinomycetemcomitans* (16%), este ultimo de menor prevalencia se encuentra asociado principalmente a la periodontitis agresiva.³⁷ Ardila y col (2012), investigó la composición de la microflora subgingival de 76 pacientes con periodontitis crónica. Los microorganismos más prevalentes fueron *P. gingivalis* (64,4 %), *F. nucleatum* (46.3 %) y *P. intermedia/nigrescens* (44,3 %).⁴⁴

Aggregatibacter actinomycetemcomitans.

Es un cocobacilo gramnegativo, requiere, de la presencia de CO₂ para su desarrollo en un porcentaje del 5 – 10 %, no produce esporas, forma colonias de aproximadamente 0.5 – 1 mm de diámetro, tiene forma circular, transparente de bordes irregulares.

Elabora un número de factores de virulencia, tales como leucotoxinas, bacteriocinas, factor inhibidor de quimiotaxis, factor inmunosupresor, factor citotóxico, proteínas unidas a los receptores Fc, lipopolisacáridos (LPS), colagenasa, epiteliotoxina; es citotóxico para los leucocitos polimorfonucleares. Los lipopolisacáridos (LPS) es una endotoxina que estimula a los macrófagos a producir IL (IL – α1, IL – β1) y factor de necrosis tumoral,

factores involucrados en la inflamación de los tejidos y reabsorción ósea, los macrófagos que migran a los sitios infectados con Aa. Serán estimulados a producir citosinas que estarán involucradas en la inflamación gingival y la reabsorción de hueso.³³

Se ha demostrado que *A. actinomycetemcomitans* posee la capacidad de invadir células epiteliales gingivales humanas y células endoteliales vasculares humanas cultivadas *in vitro* y células epiteliales vestibulares *in vivo*. Además, en algunos estudios inducía a muerte celular por apoptosis. Este microorganismo se ha aislado de lesiones periodontales crónicas pero con menor frecuencia y en menor concentración que en sujetos con PAL.¹⁰

Porphyromonas gingivalis

Los aislamientos de esta especie son bacilos anaerobios gramnegativos asacarolíticos e inmóviles cuya morfología varía entre cocoide y bacilar corta, es un miembro del muy investigado del grupo de “Bacterioides de pigmentación negra”. Los microorganismos de este grupo forman colonias de color pardo a negro

Esta especie presenta una elevada correlación con la progresión de la enfermedad, severidad y pérdida de hueso. Produce un gran número de factores de virulencia: enzimas (hidrolíticas, proteolíticas, lipolíticas y tripsina), otras proteínas y productos terminales de su metabolismo que son activas frente a un amplio espectro de proteínas del huésped.

Tiene la capacidad de adherirse a una diversidad de tejidos y células del hospedador, la habilidad de invasión y multiplicación. Las fimbrias se comportan como adhesinas y posibilitan a *P. gingivalis* la adherencia y la coagregación, especialmente

observada entre *P. gingivlis* y *fusobacterium nucleatum*, microorganismo considerado puente de la microbiota subgingival.

Se ha demostrado que el polisacárido (LPS) de esta especie induce la producción de IL-6 e IL-8. Las evidencias indican que LPS de *P.gingivalis*, especialmente su lípido A, es capaz de estimular la respuesta inflamatoria del hospedador indirectamente a través de la producción de citosinas.³³

Tanarella forsythensis

El microorganismo es un bacilo gramnegativo anaerobio fusiforme muy pleomorfo.

Es una especie difícil de cultivar porque el desarrollo de su colonias diminutas llevaba entre 7 y 14 días, la necesidad de su cultivo se superó con la inclusión del ácido N-acetilmurámico al medio, cuyo crecimiento mejora si se lo cultiva junto con *E. nucleatum* y de hecho convive con esta especie en sitios subgingivales.

Presenta una capa serrada en forma de S y se comprobó que es mediadora de aglutinación, adhesión e invasión de células epiteliales y formación de abscesos subcutáneos en ratas.

Considerada una especie gingival relativamente rara. Los estudios inmunológicos con anticuerpos monoclonales y sondas de ADN sugirieron que esta especie se encuentra en niveles muy elevados en la biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis crónica. Este microorganismo también se coagrega a *P. gingivalis* y *fusobacterium nucleatum*. Tiene actividad enzimática y proteolítica. Una enzima tipo tripsina es considerada un factor de virulencia.³³

Prevotella Spp.

Bacilo corto de extremos redondeados anaerobio gramnegativo, es un bacteroides con pigmento negro es particularmente elevada en la gingivitis ulcerosa necrosante aguda y en algunos tipos de periodontitis y en sitios de progresión de la periodontitis crónica.

P. intermedia posee ciertas propiedades de virulencia observadas en *P. gingivalis* y se comprobó que induce a infecciones mixtas cuando se la inyecta en animales de laboratorio, también se observó que invade las células epiteliales *in vitro*.¹⁰

Fusobacterium nucleatum

Es un bacilo gramnegativo fusiforme anaerobio. Aislada con frecuencia en las muestras de cultivo de placa subgingival y representaba aproximadamente el 7- 10 % de los aislamientos. Invade las células epiteliales gingivales humanas *in vitro* y provoca una secreción elevada de IL-8 por las células epiteliales, esta especie puede inducir la muerte por apoptosis de las células mononucleares y polimorfonucleares, induce la producción de colagenasas 3 en las células epiteliales. Además induce la liberación de citosinas, elastasa y radicales de oxígeno desde los leucocitos.¹⁰

3.2.2 *Rosmarinus officinalis* (romero)

3.2.2.1 Historia

Rosmarinus officinalis ha sido utilizado desde la antigüedad como planta medicinal y para la obtención de aceites esenciales³⁸. Se dice que los faraones egipcios hacían poner

sobre sus tumbas un ramillete de romero para perfumar su viaje al país de los muertos. Su aceite esencial fue obtenido por primera vez hacia el año 1330 por Ramón Llull y desde entonces, se emplea en perfumería. En el siglo XVI la reina Isabel de Hungría lo utilizó para tratar el reumatismo que padecía convirtiéndose, «el agua de la reina de Hungría», en uno de los remedios más famosos de la corte de Luis XIV. Los boticarios empleaban el romero en gran número de preparados pero en la actualidad sólo el aceite esencial está incluido en las farmacopeas.⁴⁵

El nombre genérico, *Rosmarinus* proviene de la unión de dos vocablos griegos, *rhops*, arbusto y *myrinos*, aromático; que concuerdan perfectamente con las características de la planta; el nombre específico, *officinalis*, expresa su aplicación como planta medicinal^{46,47}

3.2.2.2 Clasificación sistemática

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*

Taxonomía

Reino: *PLANTAE*

División: *MAGNOLIOPHYTA*

Clase: *MAGNOLIOPSIDA*

Orden: *LAMIALES*

Familia: *LAMIACEAE*

Género: *Rosmarinus*

Especie: *Rosmarinus officinalis*

Nombre vulgar: “romero”

3.2.2.3 Distribución geográfica

El género *Rosmarinus* es una planta originaria de la zona mediterránea se encuentra sobre todo en el sur de Europa, norte de África y suroeste de Asia. En la Península Ibérica es más frecuente en la mitad sur y en el este, desde el nivel del mar hasta una altura de 1.200 m^{42,43,44}. El género *rosmarinus* presenta varias especies entre ellas; *R. officinalis*, *R. eriocalyx* y *R. tomentosus* y otras variedades de taxones. De estos taxones, *R. officinalis* es el más ampliamente distribuido, llegando a la zona occidental de Andalucía. La variabilidad observada en su hábitat está relacionada con su gran capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales.⁴⁸

3.2.2.4 Descripción General

Es un arbusto aromático, de hasta 2 m de altura, sus tallos son gruesos y cuadrados. Las hojas son opuestas, pequeñas delgaditas de hasta 3cm de largo por 3mm de ancho, la parte superior es verde oscuro y el reverso, grisáceo o blanquecino, son blandas cuando están frescas y secas se desmoronan, sus ramas son densamente cubierto de hojas. Las flores son de color azul a pálido lila. El cáliz bilabiado de 5m de largo y una corola azul pálido, raramente blanca o rosa de olor fuerte. Florece durante todo el año.⁴⁹

3.2.2.5 Composición química

En la planta se han reportado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en^{50, 51, 52,53}:

Cuadro 1. Composición química del “romero”

Composición química de <i>Rosmarinus officinalis</i> “romero”	
Ácidos fenólicos	(cafeico, clorogénico, labiático, neoclorogénico rosmarínico), colina, taraxasterol, lupeol, campesterol, taninos.
Flavonoides	(Derivados del luteol y del epigenol), apigenina, diosmetina, diosmina, hispidulina, luteolina, cirsimarina, neopritina, sinensetina, cupafolina.
Diterpenos	(ácido carnósico, carnosol, rosmanol, rosmadial)
Ácidos triterpénicos	(ácido ursólico) 2 a 4 %
Alcoholes triterpénicos	(alfa y beta - amirina, betulósido)
Alcaloides	Pequeñas cantidades de rosmaricina
Elementos minerales:	1,11% de sodio, 1.06% de potasio, 0.63% de calcio, 0.23 % de magnesio. 17ppm de hierro, 10 ppm de cobre, 26 ppm de zinc, 15 ppm de manganeso
Aceite esencial 1,2 a 2 %	1,8-cinelol (30 - 40%), alcanfor (15 - 25%), borneol (16 - 20%), acetato de bornilo (hasta 7%), α -pineno (25%) como así como β -pineno, linalol, canfeno, subinene, mirceno, α -felandreno, α -tirpene, limoneno, p-cimeno, terpinoleno, thujeje, copalene, terpinen-4-ol, α -terpineol, cariofileno, metil chavicol, timol.

3.2.2.6 Propiedades del romero

Los compuestos presentes en *R. officinalis* L. planta rica en principios activos, presenta acción sobre casi todos los órganos de cuerpo humano. Al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético, emenagogo y antigodanotrópico⁵⁴.

Actividad antibacteriana.

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presentó actividad en bacterias de la cavidad oral¹¹ y en bacterias del tracto gastrointestinal¹⁷. Los Extractos hidroalcohólicos también muestran actividad en bacterias de la cavidad oral^{12,13} y en enterobacterias^{15,16}

El extracto de hoja de *R. officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias, la actividad citotóxica afecta directamente a la fase mitótica de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por destacar, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*, estos microorganismos son susceptibles a los componentes del extracto de romero, en cuyo extracto prevalecen el ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnosólico y flavonoides⁵⁵.

Actividad antifúngica.

El extracto glicólico de *R. officinalis* L. mostró efectos fungistáticos y fungicidas sobre cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* aislada de la cavidad oral de pacientes que utilizaron antibióticos prolongados⁵⁶.

Efectos antioxidantes.

Se ha observado en estudios *in vitro*, la actividad antioxidante ha sido atribuida al rosmanol, carnosol y al ácido carnósilico; a estos dos últimos se les considera responsables del 90 % de la actividad.⁵¹ El ácido carnósico es un excelente inactivador de radicales peróxilo, es decir es un antioxidante primario, y no solo inhibe la formación de hidroperóxidos sino también previene su descomposición, esta actividad se incrementa conforme el pH disminuye⁵².

Actividad antiviral.

Estudios *in vitro* en células demuestran que el extracto acuoso de *R. officinalis* mostró una alta actividad antiviral contra el herpes simple tipo 1, tipo 2 y una cepa resistente al aciclovir, el extracto afecta HSV antes de la adsorción, pero no tienen efecto en la replicación del virus intracelular. Por lo tanto, los extractos ejercen su efecto antiviral sobre el HSV libre y ofrece la posibilidad de usar una aplicación tópica terapéutica frente a las infecciones por herpes recurrentes⁵⁷.

Efectos antiinflamatorios.

El ácido rosmarínico inhibe el mecanismo complemento-dependiente de las reacciones inflamatorias; reduce el edema inducido en rata e inhibe la anafilaxis cutánea pasiva; el extracto metanólico de “romero”, aplicado tópicamente en ratones, inhibe la inflamación de la piel y la hiperplasia producida por compuestos químicos.⁴⁹

Efectividad antitumoral.

En estudios realizados *in vivo* como *in vitro* el ácido carnosico contenido en el aceite esencial ha demostrado un efecto incrementando la apoptosis de las células del cáncer

hepático, la inhibición del glioma inducido por el factor de necrosis tumoral y la protección frente al tumor cutáneo y mamario inducido en ratones⁵².

Actividad en el sistema nervioso central.

El efecto neuroprotector de extracto de *R. officinalis* L. fue investigada contra la acrilamida (neurotóxico) en ratas albinas. La administración de extractos de hojas de “romero” causa disminución de epinefrina, norepinefrina y dopamina en diferentes áreas del cerebro, efecto que se atribuyó a la presencia del ácido cafeico y el ácido rosmarínico, también detectaron que la presencia de ácido ursólico y carnosol, este incrementa los niveles de óxido nítrico de tal forma que disminuye el contenido de catecolaminas lo que implicaría el efecto neuroprotector⁵⁸.

3.2.2.7 Mecanismo de acción.

Los polifenoles desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, donde pueden retrasar el crecimiento debido a que cambian las condiciones del medio y penetran en la membrana celular de los microorganismos provocando lisis. Se ha reportado que algunos ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido rosmérico, ácido cafeico) son compuestos que inhiben el crecimiento de algunas bacterias. Algunos flavonoides tienen su participación en la inhibición debido a que estos generalmente se relacionan con la inhibición de síntesis de ADN y ARN y otras macromoléculas.²⁶

3.2.2.8 Reacciones adversas

El aceite esencial puede producir cefaleas, espasmos musculares, gastroenteritis, irritación del endotelio renal; en dosis altas puede resultar neurotóxico

(convulsivante) y abortivo. En uso tópico es rubefaciente, por lo que hay que evitar el contacto con las mucosas y zonas de la piel alteradas⁵⁹.

Se aconseja no administrar el aceite esencial durante el embarazo, periodo de lactancia, en niños pequeños, pacientes con gastritis, úlceras gastroduodenales, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, hepatopatías, epilepsia, Parkinson u otras enfermedades neurológicas. No aplicar a personas con alergias respiratorias o con hipersensibilidad conocida a éste u otros aceites esenciales.²⁶

3.2.2.9 Uso del romero en la medicina.

El ácido rosmarínico se absorbe bien en el tracto gastrointestinal y de la piel. Se aumenta la producción de prostaglandina E2 y reduce la producción de leucotrieno B4 en los leucocitos polimorfonucleares humanos, e inhibe el sistema del complemento. Se concluye que el “romero” y de sus componentes derivados del ácido cafeico especialmente tales como el ácido rosmarínico tienen un potencial terapéutico en el tratamiento o prevención del asma bronquial, trastornos espasmogénico, úlcera péptica, enfermedades inflamatorias, hepatotoxicidad, aterosclerosis, enfermedad cardíaca isquémica, catarata, cáncer y pobres motilidad espermática⁵⁰.

3.2.3 Clorhexidina

3.2.3.1 Historia

La clorhexidina se desarrolla en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra por científicos en un estudio contra la malaria, aunque nunca fue

utilizada con este fin. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos 20 denominados polibiguanidas que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para las heridas de la piel. Posteriormente comenzó a utilizarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano.

En odontología empezó a utilizarse para desinfección de la boca y en endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia, fue el realizado por Løe y Schiott en 1970 donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0.2 % en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y el desarrollo de gingivitis. Según Altannir y colaboradores en 1994 la clorhexidina es de uso corriente en más de noventa países y que más diez mil millones de aplicaciones de digluconato de clorhexidina han sido llevadas a cabo en los dos últimos años.⁶⁰

En 1999, una nueva propiedad de la clorhexidina fue descubierta por Gendron y col. quienes demostraron que soluciones de clorhexidina pueden inhibir la actividad proteolítica de las MMPs -2, -8 y -9. Estas MMPs juegan un importante papel en las enfermedades inflamatorias destructoras de tejidos como la periodontitis, y con este trabajo fue mejor comprendido el efecto benéfico de la clorhexidina en el tratamiento de esta enfermedad.⁶¹

3.2.3.2 Características

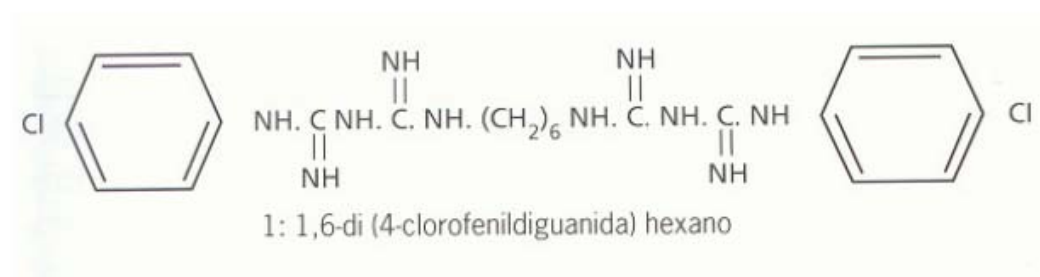


Grafico 1. Estructura química de clorhexidina.

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que decimos que es una bisguanida, la cual está conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida. Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a PH superior a 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que lo hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y su dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en su forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua.⁶²

3.2.3.3 Mecanismos de acción.

Clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).⁶³

En boca se adsorbe rápidamente a las superficies de contacto, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. Los depósitos de clorhexidina se forman por la interacción reversible de la molécula de clorhexidina con grupos fosfato, sulfato y carboxilo de los tejidos blandos y duros⁴⁹

La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8 -12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo ⁶⁰.

3.2.3.4 Espectro de acción.

Clorhexidina tiene un extenso espectro de actividad antimicrobiana. Es activa frente a un amplio rango de organismos Gram + y Gram- así como sobre hongos. Estos microorganismos no tienen el mismo grado de sensibilidad a clorhexidina^{63,64}. Por ejemplo los microorganismos Gram + son más sensibles que los Gram-, mientras que los estreptococos son más sensibles que los estafilococos.

3.2.3.5 Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos de clorhexidina, indican que aproximadamente el 30 % del principio activo, se retiene en la cavidad oral después del enjuague. La clorhexidina retenida se libera lentamente en los fluidos orales. Estudios realizados en animales y en humanos, demuestran la escasa absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal. Los niveles plasmáticos de clorhexidina alcanzan un pico máximo de 0.206 microgramos por gramo en humanos, 30 minutos después de la ingestión de 300 mg de clorhexidina. No se encontraron niveles detectables en plasma de clorhexidina después de 12 horas de la ingesta.⁶⁵

3.2.3.6 Concentración

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0.12 % y al 0.2 %, se recomienda realizar un buche con 10 ml de producto a una concentración del 0.2 % y de 15 ml al 0.12 %, esto es debido a la dosis total de clorhexidina ya que 10ml al 0.2 % libera 20 mg y 15 ml al 0.12 % libera 18 mg, observándose que los resultados con ambas formulaciones son igual de efectivos.

Las últimas investigaciones van encaminadas a conseguir una formulación de clorhexidina en medio no alcohólico igual de efectiva que la formulación de la misma en solución alcohólica. Según el estudio de se consigue con una combinación de clorhexidina al 0.12 % sin alcohol a la que se añade cetilpiridinio al 0.005 % (nueva formulación de Perio Aid), resultando igual de efectiva en el control de la formación de nueva placa que clorhexidina con alcohol al 0.12 % (Perio Aid) y que clorhexidina con alcohol al 0.2 % (Corsodyl).⁶⁶

3.2.3.7 Indicaciones

Aplicaciones: antisepsia de la piel en solución acuosa al 4 % con base detergente para el lavado corporal prequirúrgico del paciente y lavado de manos quirúrgico. También y en solución acuosa al 5 % para antisepsia del campo quirúrgico. Por su afinidad con la piel tiene una acción remanente de varias horas de duración. Sobre heridas se utiliza a la concentración 0.1 ó 0,5 % en solución acuosa. Además puede emplearse en Ginecología, en quemaduras (ya que puede mezclarse con antibióticos de acción sinérgica) y en higiene del personal hospitalario.

Se ha valorado su uso en antisepsia del cordón umbilical y, si bien, se ha demostrado muy efectiva al reducir la colonización bacteriana, alarga el tiempo de desprendimiento y aumenta la colonización ulterior⁶⁵. Aunque uno de sus usos es la higiene bucal, no se suele emplear, excepto si va unida a edulcorantes potentes, pues es muy amarga.⁶⁰

3.2.3.8 Efectos adversos

El efecto colateral más frecuente en la utilización de clorhexidina es la tinción de dientes y restauraciones, así como de resina y porcelanas. No parece claro si la tinción es dosis dependiente así Rebstein en 1978 concluyó que no lo era, ya que reduciendo la concentración de clorhexidina al 0.0025 %, seguían presentándose las manchas.

Las tinciones suelen localizarse en el tercio cervical de la corona y en las zonas interproximales. Las manchas son más evidentes en la unión amelocementaria expuesta o superficies radiculares, fosas y fisuras.

La seguridad de la clorhexidina ha sido ampliamente documentada en la literatura. Kenney en 1972 informa que una exposición de dos minutos a clorhexidina al 0.2 %, puede producir alteración de la membrana celular en algunos polimorfonucleares. Se han descrito también lesiones descamativas en la mucosa alveolar después de enjuagues con clorhexidina al 0.2 %. La descamación de células epiteliales puede suceder con alta concentración más frecuentemente que con baja.⁶⁰

3.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **Actividad antimicrobiana:** Acción de una o más sustancias que impiden o no, el desarrollo de los microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y virus.
- **Actividad antibacteriana:** Es la acción que ejerce una sustancia en el desarrollo o crecimiento de las bacterias.
- **Bacteria anaerobia:** Bacteria que se desarrolla en condiciones donde existe una mínima o nula cantidad de oxígeno, como una bolsa periodontal.
- **Extracto etanólico:** Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente (en este caso alcohol etanólico), en proporción variable, capaz de solubilizar los principios activos.
- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen.
- **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un pocillo embebido de una sustancia en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con microorganismos.
- **Tamizaje fotoquímico:** Análisis cualitativo que se le realiza a los extractos de plantas naturales para identificar los compuestos (por ej.: Alcaloides, Taninos, Flavonoides, Quinonas, etc.) que contiene dicho extracto.

3.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.4.1 Hipótesis

Existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal.

3.4.2 Variables

Variable independiente: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero).

Variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero).

Variables de control

Control positivo: Clorhexidina al 0.12 %

Control negativo: Agua destilada

3.5 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES	CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADORES	ESCALA	CATEGORIA
Variable Independiente Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i>.	Soluciones a determinada concentración.	Concentración de la sustancia Concentración de la sustancia Concentración de la sustancia	Cualitativa nominal Cualitativa nominal Cualitativa nominal	Solución EERO 25mg/ml al Solución EERO 50mg/ml al Solución EERO 75mg/ml al
Variable dependiente ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	Capacidad inhibitoria del crecimiento de bacterias anaerobias por acción de las sustancias en estudio, en bacterias aisladas de bolsa periodontal de pacientes con enfermedad periodontal.	Diámetro del halo de inhibición	Cuantitativa razón	mm

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de investigación

Experimental; Porque se valoró el efecto de una o más variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.

Prospectivo; Porque los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo en el futuro.

In vitro; Porque la técnica para realizar el experimento se realizó en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

4.2 Población y muestra

4.2.1 Población

Constituido por pacientes que acudieron a la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el año 2013.

4.2.2 Muestra

Conformado por 24 pacientes con periodontitis crónica de ambos géneros de 35 – 60 años de edad, que acudieron a la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el año 2013.

4.2.2.1 Elección de la muestra

Los pacientes se eligieron en forma intencional y no probabilística, conformado por 24 pacientes con periodontitis crónica de la Clínica de la Facultad de Odontología la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.2.2.2 Unidad de análisis

El exudado obtenido de bolsas periodontales de un paciente; profundidad mayor de 4mm; de 24 pacientes de 35 – 60 años de edad, que acudieron a la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el año 2013.

4.2.2.3 Criterios de inclusión de muestra

- Pacientes ambulatorios de ambos sexo.
- Pacientes con presencia de bolsa periodontal clínicamente y radiográficamente.
- Pacientes adulto entre 35-60 años.
- Pacientes que firmaron su consentimiento informado para la obtención de muestra.

3.2.2.4 Criterios de exclusión de muestra

- Pacientes con presencia de pseudo bolsas periodontales.
- Pacientes con terapia farmacológica que predisponga a enfermedad periodontal.
- Pacientes bajo tratamiento médico con antibióticos.
- Pacientes usen antisépticos orales o colutorios.

4.3 Recursos y materiales

4.3.1 Recursos Ambientales:

Para el presente trabajo de investigación se contó con las siguientes facilidades:

- Apoyo en la preparación del extracto de *Rosmarinus officinalis* por el Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la universidad Nacional Mayor de San Marcos

- Apoyo de la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Apoyo en la realización del trabajo por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.3.2 Materiales:

- Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (EERO)
- Clorhexidina 0.12 %.
- Agua destilada.
- suero fisiológico
- Agar Schadler.
- Caldo de tioglicolato
- Sobre de anaerobiosis Anaerocult (Merck®)
- Reactivos para tamizaje fitoquímico.

4.3.3 Equipos:

- Instrumentos para la obtención del extracto etanólico del romero.
- Balanza de precisión.
- Materiales de diagnóstico odontológico.
- Envases estériles para la recolección de la muestra.
- Instrumentos para la siembra microbiológica.
- Gradilla.

- Hisopos esteriles
- Micropipetas.
- Conos de papel.
- Placas Petri.
- Mechero de vidrio.
- Estufa de incubación.
- Tubos de ensayo.
- Varillas de vidrio.
- Caja aislante de temperatura para el transporte de las muestras.

4.3.4 Otros:

- Fichas de recolección de datos
- Lapiceros y lápices.
- Computadora.
- Programa estadístico SPSS.
- Impresiones.
- Anillados y empastados.

4.4 Procedimientos y técnicas

4.4.1 Obtención del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero)

Se recolectaron tallos, hojas y flores de *R. officinalis*, proveniente del valle de Tarma provincia de Tarma departamento de Junín (3.050 msnm.) la materia prima fue conservada a temperatura ambiente y sin desecar.

La muestra recolectada fue identificada taxonómicamente por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.(ver anexo)

Se usó las hojas frescas de *R.officinalis* previamente seleccionadas, estas fueron lavadas con agua y secado por 48 horas para que esté libre de humedad.

Se procedió a colocar en un frasco de vidrio de color ámbar 1Kg. de las hojas luego se le agregó una mezcla hidroalcohólica al 80 % (etanol), dejándose macerar por 1 semana, agitándolo todos los días.

El producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatmann N° 41, un segundo filtrado fue realizado con papel filtro Whatmann N° 2 y por último un tercer filtrado fue en papel Whatmann N° 1. Obteniéndose 600 ml de extracto purificado libre de gérmenes.

Luego fue colocado en una estufa para ser secado, al cabo del cual se obtuvo una masa de extracto seco de *R. officinalis* de 41 g.

A partir de la masa de extracto seco de *R. officinalis* se prepararon concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml las que fueron preparadas cada vez que se iba hacer un uso inmediato de dicha sustancia.

4.4.2 Obtención de la muestra

Selección de pacientes

Se seleccionó entre los pacientes que acudieron a la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante el año 2013, se

eligió 24 pacientes adultos entre 35 y 60 años de edad, todos ellos presentaron periodontitis crónica diagnosticado en dicho centro y que aún no habían iniciado tratamiento para dicha enfermedad. A cada paciente se le solicitó su consentimiento informado para ser partícipe de este estudio.

Toma de la muestra

Se revisó la historia clínica de cada paciente y se realizó el examen clínico seleccionando la pieza dentaria con mayor profundidad de sondaje. Se colocó una punta de papel Nº 30 dentro del saco periodontal durante 20 seg, procurando no alterar la forma del cono de papel. Se retiró la punta y se recolectó en un medio de transporte de caldo de Tioglicolato para mantener la viabilidad del microorganismo.

Incubación de la muestra

Una vez obtenida la muestra, esta fue transportada al laboratorio en tubos de caldo de Tioglicolato para su incubación a 37 °C por 24 horas.

4.4.3. Prueba de actividad antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en pocillos.

- Se utilizó como medio de cultivo el agar Schaedler, para bacterias anaerobias.

- Se enumeró cada placa con números arábigos del 1 al 24 en relación al número de muestras tomadas. Se marcó en la base de la placa con puntos debidamente rotulados que indican la posición de los pocillos y el tipo de solución para cada uno.
- Se procedió a la dilución de la muestra utilizando suero fisiológico estéril, cuya turbidez de la suspensión se ajustó al estándar 0.5 de la escala de McFarland.
- El inóculo para la siembra se obtuvo con un hisopo embebido en la suspensión del tubo preparado y se sembró sobre la superficie del agar, hasta obtener una distribución uniforme del inóculo.
- Se procedió a realizar los pocillos en la superficie del agar Schaedler con un sacabocado.
- Luego se llenó con una pipeta (50 µL de la sustancia) los pocillos. Cada sustancia en su respectivo número asignado.
- Se dejó reposar las placas por 30 minutos y posteriormente se colocó en una jarra de anaerobiosis para su incubación durante 48h a una temperatura de 37°C.

Coloración Gram: se tomó microorganismos que crecieron alrededor de los halos, se los llevó a una placa y se procedió a realizar la coloración Gram. Al llevarlo al microscopio se observó que estos pertenecían al grupo de bacterias cocos y bacilos Gram negativos.

4.5 Recolección de datos

Se midió el diámetro de los halos de inhibición con un calibrador debidamente milimetrado en la base de la placa, se registraron los datos en una ficha de recolección de datos.

4.6 Procesamiento de datos

Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se midió y compararon los diámetros del halo de inhibición entre los grupos que presentaban EERO y clorhexidina 0.12 %.

El análisis se realizó con Software SPSS V20. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de la distribución de datos, así como también prueba de Levene para verificar la homogeneidad. Para establecer si hubo diferencias de los halos de inhibición por solución se utilizó la prueba de Anova. Se aplicó la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey entre el grupo de estudio EERO, el grupo control positivo (clorhexidina 0.12%) y de control negativo (agua destilada), a fin de evaluar las diferencias significativas que puedan existir en relación al promedio del diámetro de inhibición.

V. RESULTADOS

Cuadro 2. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* a diferentes concentraciones.

		Concentración de la sustancia				
		EERO 25mg/ml	EERO 50mg/ml	EERO 75mg/ml	Clorhexidina al 0,12%	Agua destilada
Halo de Inhibición (mm)	Media	9,10	11,45	13,35	13,43	5,00
	Desv. típ.	1,429	1,927	2,388	1,461	0,00
	Mínimo	6,0	8,0	10,0	11,0	5,0
	Máximo	11,5	15,0	19,0	16,0	5,0

EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Diámetro de pocillos: 5mm.

Se presenta la efectividad antimicrobiana de las diferentes diluciones del extracto de romero sobre bacterias anaerobias frecuentes en bolsa periodontal. Se observa los promedios del halo de inhibición de las soluciones experimentales. Los promedios de halo de inhibición incluye el diámetro del pocillo (5mm). El menor promedio del halo de inhibición corresponde al agua destilada (5 mm) el cual representa una actividad antimicrobiana nula. Se encontró un similar promedio entre el halo de inhibición de la clorhexidina al 0,12% (13.43 mm) con el EERO 75 mg/ml. (13.35 mm) el cual no se traduce en una diferencia estadística. Con un intervalo de confianza del 95 %.

Para contrastar la normalidad de la distribución de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk de manera general se obtuvo un valor $p > 0.05$. Test necesario para que el resultado de algunos análisis sea fiable.

Cuadro 3. Diferencias entre la actividad antimicrobiana promedio del extracto etanólico de *R. officinalis* y las soluciones de control.

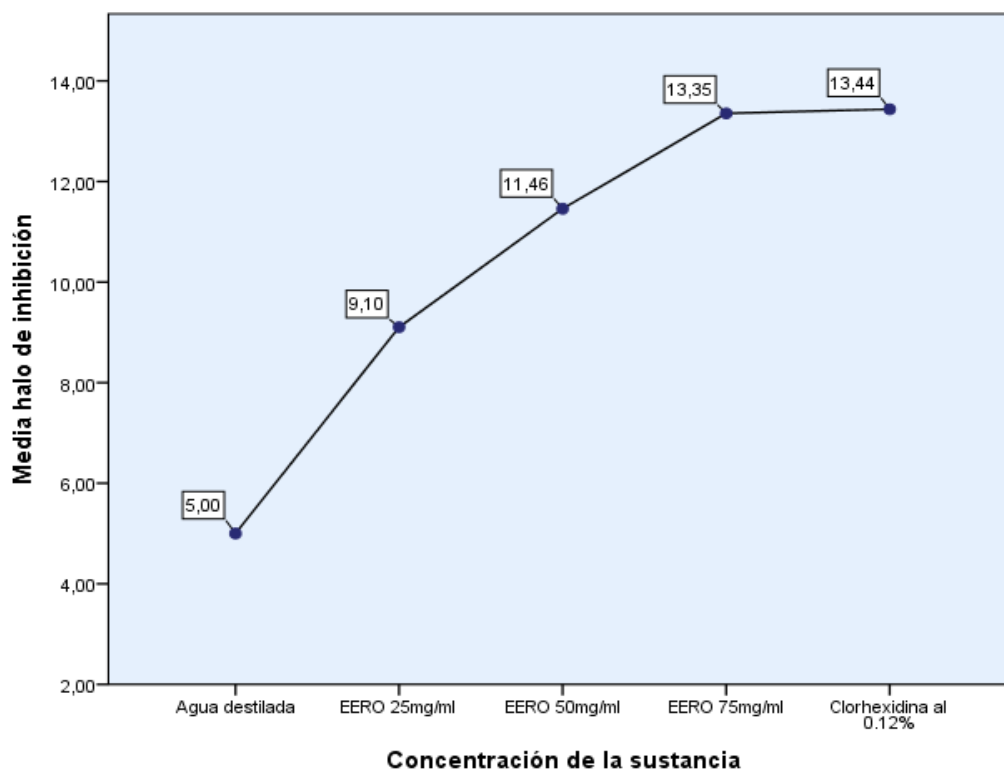
(I) concentración de la sustancia	(J) concentración de la sustancia	Diferencia de medias (I-J)	p
EERO 75mg/ml	EERO 25mg/ml	4,25	,000
	EERO 50mg/ml	1,89	,001
	Clorhexidina al 0.12%	-,08	1,000
	agua destilada	8,35	,000
Clorhexidina al 0.12%	EERO 25mg/ml	4,33	,000
	EERO 50mg/ml	1,97	,001
	EERO 75mg/ml	,08	1,000
	Agua destilada	8,43	,000
Agua destilada	EERO 25mg/ml	-4,10	,000
	EERO 50mg/ml	-6,45	,000
	EERO 75mg/ml	-8,35	,000
	Clorhexidina al 0.12%	-8,43	,000

EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Diámetro de pocillos: 5mm.

Se realizó la prueba estadística Anova la cual dio como resultado $p(0.000) < 0.05$ por lo cual existen diferencias significativas entre las concentraciones de las sustancias. La prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey entre las distintas diluciones y los grupo control dio como resultado: para EERO 75mg/ml frente a la clorhexidina dio un valor $p(1.00) > 0.05$ (estadísticamente no significativo). A diferencia de la clorhexidina frente al EERO 25mg/ml con un valor $p(0.00) < 0.05$ (estadísticamente significativo).

Grafico 2. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *R. officinalis* sobre cultivos de bacterias anaerobias de bolsa periodontal.



EERO: Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Diámetro de pocillos: 5mm.

Se presenta la efectividad antimicrobiana de las diferentes diluciones del extracto de romero sobre bacterias anaerobias frecuentes en bolsa periodontal. Se observa que las medias de los halos de inhibición formados van en relación directamente proporcional a las concentraciones del extracto de *R. officinalis*; es decir que a medida que la concentración de extracto etanólico de *R. officinalis* se incrementa, también hay un incremento en el promedio en el halo de inhibición. La clorhexidina al 0,12 % no muestra diferencias estadísticamente significativa con respecto al EERO 75 mg/ml.

VI. DISCUSIÓN

En los últimos años algunas plantas medicinales en nuestro país están siendo investigadas y utilizadas en el área de la salud oral en diversas formulaciones farmacéuticas así tenemos: los enjuagues bucales colutorios, soluciones tópicas pasta dental, entre otros. Debido a los beneficios que ofrece a la población tanto en el aspecto terapéutico como económico.

Las enfermedades periodontales siguen siendo aun altamente prevalentes en las sociedades de hoy y es necesario nuevas estrategias en el tratamiento de la enfermedad periodontal. La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa caracterizada por la inflamación de los tejidos de soporte del diente, causado por diversos factores, principalmente por un aumento y diversidad especies patógenas bacterianas. El tratamiento de la periodontitis crónica se basa en el debridamiento mecánico de la placa bacteriana y la instauración de medidas de control del biofilm dental realizado por el uso de antisépticos como clorhexidina, debido a la actividad antimicrobiana que este presenta, durante las primeras fases de la terapia periodontal.

El uso de la clorhexidina ha demostrado ser un antimicrobiano eficaz, pero diversos esquemas proponen mejorar el tratamiento con este agente debido a los efectos secundarios adversos que ha producido en los pacientes tratados.

Rosmarinus officinalis es una planta que ha demostrado en gran parte de las investigaciones presentar propiedades antimicrobianas. La actividad antimicrobiana de *R. officinalis* contra un amplio rango de microorganismos patógenos como bacterias, hongos, levaduras y los virus, están siendo estudiado por la comunidad científica incluso aplicándola en otras áreas afines a la medicina.

Los polifenoles desempeñan un papel importante en la protección contra agentes patógenos, inhibiendo su crecimiento según Monroy A. y col (2009)²⁶ Barni M. y col (2009)²⁸ Para confirmar la presencia de fenoles que le da propiedad antibacteriana al extracto etanólico de *R. officinalis* se analizó una muestra del EERO, a fin de conocer si la descripción de las características físicas y la presencia de fenoles corresponden o son similares a los ya estudiados. En la especie recolectada del valle de Tarma se confirmó la presencia de fenoles en la muestra enviada al laboratorio, también hubo algunas diferencias como la ausencia de flavonoides.(ver anexo)

Se comprobó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *R. officinalis* sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, observándose halos de inhibición que varían desde 10 a 19 mm cuando se trabajó con EERO 75mg/ml.

La sensibilidad de las bacterias periodontopatogenas es consistente con los hallazgos de autores como: Takarada K. y col. (2004)¹¹, comprobó que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* con una concentración inhibitoria mínima de 0.5% inhibió el crecimiento de las bacterias Gram-negativas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Dalirzani Z. y col. (2011)²⁰ demostró el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *R.officinalis* sobre *Streptococcus mutans*, la media de la zona de inhibición fue $11,52 \pm 0,96$ significativamente menor que la clorhexidina (14.07 ± 1.70). Castaño H. y Col. (2010)¹⁶ comprobaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*. Monroy A. y Col. (2009)²⁶ evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis*

in vitro contra *Listeria monocitogenes*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, donde encontraron una inhibición del 90% de las UFC. Alves M. y Col. (2008)¹² estudiaron la actividad antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* sobre especies de microorganismos predominantes en el biofilm supragingival, como en cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus casei* demostró ser susceptible a la acción del observándose halos de inhibición de 11 a 20mm. Silva M. y Col. (2008)¹³ comprobaron actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *R. officinalis* sobre cepas estándar como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus casei*, Se observó halos de inhibición del crecimiento bacteriano de 11 a 18 mm.

La actividad antimicrobiana que ha demostrado el extracto etanólico de *R. officinalis* sobre cultivos *in vitro* podría deberse a la acción de compuestos fenólicos, diterpenos fenólicos, ácido carnósico, carnosol y del ácido rosmarínico, como el encontrado por Barni M y col. (2009)²⁸. El extracto de hoja de *R. officinalis* afecta a la membrana celular de las bacterias, la actividad citotóxica afecta directamente a la fase mitótica de las bacterias Gram positivas y Gram negativas descrito por Miresmailli S. (2006)⁵⁵

Este estudio permite valorar la propiedad antimicrobiana del romero peruano frente a microorganismos frecuentes en la enfermedad periodontal. Teniendo en cuenta la aceptación que existe por la medicina natural por parte de la población y de acuerdo a los resultados finales se puede optar por medidas de prevención y/o tratamiento que incluyan al romero dentro de pastas o colutorios, no sin antes realizar estudios sobre modelos *in vivo* durante el tratamiento de la enfermedad periodontal.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *R. officinalis* presenta actividad antimicrobiana *in vitro* sobre cultivos de bacterias frecuentes en pacientes con enfermedad periodontal como la periodontitis crónica.
- La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* a 75 mg/ml es igual a la actividad antimicrobiana de la clorhexidina al 0,12 % por lo que se concluye que es efectivo usar sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.
- A medida que se aumenta la concentración del extracto etanólico de *R. officinalis* (de 25 mg/ml a 75 mg/ml) se obtiene un mayor diámetro del halo de inhibición, sin embargo no se consigue superar la acción inhibitoria alcanzada por clorhexidina al 0,12 %.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del extracto etanólico de *R. officinalis*.
- Realizar investigaciones con soluciones de extracto etanólico de *R. officinalis* en concentraciones mayores a 75 mg/ml a fin de conocer si existe una actividad antimicrobiana mayor al de clorhexidina al 0,12 %.
- Realizar estudios *in vivo* con el extracto etanólico de *R. officinalis* en pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal a fin de verificar si existe actividad antimicrobiana.
- Ampliar la investigación hacia formulaciones de pastas y colutorios dentales que contengan extracto etanólico de *R. officinalis*.
- Realizar más estudios que demuestren las propiedades de *R. officinalis* y pueda utilizarse como posible medicación en la terapéutica clínica odontológica.

IX. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis in vitro* sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, tomando como control positivo a la clorhexidina 0,12 %. Se seleccionaron 24 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, que acudieron a atenderse en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se procedió a tomar la muestra con conos de papel número 30 se colocó dentro del saco periodontal durante 30 segundos, luego se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Se utilizó el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó en condiciones de anaerobiosis, por 48 h a 37 °C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. De los resultados se comprobó que existe igual actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* a una concentración de 75mg/ml con la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

Palabras claves: periodontitis crónica, *Rosmarinus officinalis*, clorhexidina, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the antimicrobial activity of the ethanol extract of *R. officinalis* in vitro on cultures of anaerobic bacteria common in patients with chronic periodontitis, using as a positive control to 0.12% chlorhexidine. We selected 24 patients with clinical and radiographic diagnosis of chronic periodontitis, who came to care at the clinic of the Faculty of Dentistry of San Marcos. He proceeded to take the sample with paper cones placed 30th in the periodontal pocket for 30 seconds, then took the samples to the microbiology laboratory for processing. We used the well diffusion method with the experimental solutions and incubated under anaerobic conditions for 48 h at 37 ° C, and then proceed to the reading of the inhibition zone diameters. From the results it was found that there is equal antimicrobial activity of the ethanol extract of *R. officinalis* 75mg/ml at a concentration of 0.12% chlorhexidine on cultures of anaerobic bacteria common in patients with chronic periodontitis.

Keywords: chronic periodontitis, Rosmarinus officinalis, chlorhexidine antimicrobial activity.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pallar T, Plantas Útiles para Emergencia y Primeros Auxilios. II Congreso Internacional de Medicinas Tradicionales. Área Farmacognosia; 1988 Junio 26-29; Lima, Perú.
2. Calixto M. Plantas medicinales utilizadas en odontología parte I. Kiru 2006; 3(2): 80-85.
3. Afonso M. y col. La actividad antimicrobiana y antioxidante del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) filetes de tilapia (*Oreochromis spp*) saladas durante el almacenamiento congelado. Revista Brasileira de Plantas Medicinai 2008; 10(2): 12-17.
4. Alonso J. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS Ediciones SRL, 1998.
5. Arruda TA. Estudio etnofarmacobotanico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales [Tesis]. Paraíba, Brasil: Universidad Estatal de Paraíba. 2002.
6. Amorim JA. Fitoterapia y salud de la comunidad popular: propuesta para el diagnóstico integración en los servicios de salud en Campina Grande, Paraíba, Brasil. [Tesis]. Bauru, São Paulo, Brasil: Universidad de São Paulo. 1999.
7. Tránsito M, López L. El romero Planta aromática con efectos antioxidantes. Ambito Farmaceutico Fitoterapia 2008 jul/ago; 27(7): 123-129.
8. Perú ecológico. Romero (*Rosmarinus officinalis*); [2 paginas] http://www.peruecologico.com.pe/flo_romero_1.htm; consultado Setiembre 17, 2012.
9. Haffajee, AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000 1994; 5: 78-111.
10. Lindhe J. Periodontología clínica e Implantología odontológica. 4ta ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2005.

11. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 61-64.
12. Alves PM, Pereira JV, Higinio JS, Pereira MSV, Queiroz LMG. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. *Arquivos em Odontologia* 2008 Abril/Junio; 44 (02): 53-58.
13. Silva. MSA, Silva MAR, Higinio JS. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008 Abr./Jun.; 18(2): 236-240.
14. Ministerio de salud del Perú. Salud bucal
http://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13
 consultado febrero 12, 2013.
15. Cordeiro CGH, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM Análisis farmacognóstico y la actividad antibacteriana de los extractos de plantas utilizados en la formulación para la higiene bucal. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2006 jul./set;42(3):395-404.
16. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la facultad de Química Farmacéutica Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia* 2010; 17 (2): 149-154.
17. Volcão LM, Marques JL, Ribeiro GA. Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en patógenos alimentarios. XX Congreso de iniciación científica, II Muestra Científica UFPEL 2011.

18. Pinheiro MA, Brito DBA, Almeida LFD, Cavalcanti YW, Padilha WWN. Efecto antimicrobiano de productos de tñido naturales en las bacterias causantes de la caries. Rev Bras Promoç Saúde 2012 abr./jun; 25(2): 197-201.
19. Teixeira L. Avaliação do uso do Extrato de Alecrim de Jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do Biofilme Dental [Tesis]. Curitiba, Brasil: Universidad Federal de Paraná. 2012.
20. Dalirsani Z, Aghazadeh, Adibpour M, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Mosannen Mozaffari P., Mehdipour M, Taghavi Zenooz A. *In vitro* Comparison of the Antimicrobial Activity of Ten Herbal Extracts Against *Streptococcus mutans* with Chlorhexidine. *Journal of Applied Sciences* 2011 Feb; 11(5): 878-882.
21. Mahmoudvand M, Abbasipour H, Basij M, Hosseinpour MH, Rastegar F, Nasiri MB. Fumigant toxicity of some essential oils on adults of some stored-product pests. Chilean journal of agricultural research 2011; 71(1): 83-89.
22. Battagin J. Cinética enzimática e efeito de extratos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de streptococcus mutans [Tesis]. Bragança paulista, Brasil: Universidade são Francisco.2010.
23. Hussain AL, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 2010; 41: 1070-1078.
24. Rojas J, Solís H, Palacios O. Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales. An Fac med. 2010;71(3):161-5.
25. Arévalo Y, Robledo S, Muñoz D, Granados D, Cuca L, Delgado G. Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre Leishmania braziliensis. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2009; 38 (2):131-141.

26. Monroy A, García I, Totosa A. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos etanólicos de romero y chile ancho y su aplicación en un batido cárnico. *Nacameh* 2009; 3(1): 21-32.
27. Ardila M, Vargas A, Pérez J, Mejía L. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud* 2009 ene/dic; 8:47-57.
28. Barni M, Fontanals A, Moreno S. Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. contra *Staphylococcus aureus* en dos modelos de infección en piel de ratón. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2009;8 (3):219-223.
29. Valones MAA, Araujo JM, Hgino JS, Carvalho AAT. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim) sobre bactérias da cavidade oral (*S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei*) [32 paginas] <http://www.dermage.com.br/dermage/paginas/avaliacao-da-ativ-antimic-do-alecrim.pdf> consultado 17 de set 2012
30. Genena AK, Hense H, Smânia A, Souza SM. Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) – estudo da composição, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos com dióxido de carbono supercrítico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2008 abr/jun; 28 (2): 463-469.
31. Hentz S, Santin N. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. *Evidência Joaçaba* 2007 jul/dez;7 (2): 93-100.

32. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 2000; 31: 247-256.
33. Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2009.
34. Organización Panamericana de la salud, Oficina sanitaria panamericana, oficina regional de la Organización mundial de la salud. Salud en las Américas, 2007. volumen I—regional. Publicación Científica y Técnica No. 622. Washington, D.C. 2003, E.U.A. 2007. 148 p.
35. Alvear F, Vélez M, Botero L. Factores de riesgo para las enfermedades periodontales. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* 2010; 22 (1):109-116.
36. Carranza F. Periodontología clínica. 6ta ed. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2001.
37. Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología* 2005; 17(2): 79-87.
38. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000. 2002; 29:7-10.
39. Otero J, Proaño D. Prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y necesidad de tratamiento en el personal de tropa masculino en Servicio Militar en Lima en el año 2000. *Revista Estomatológica Herediana* 2005; 15(1): 11 -17.
40. Rojo N, Flores A, Arcos M. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Revista Odontológica Mexicana* 2011 ene/mar; 15 (1):31-39.
41. Kinane D. Causas y patogenia de la enfermedad periodontal, *Periodontology 2000 (Ed Esp)* 2002; 1: 8-20.

42. Mujica C, Castillo M, Daille LK, Fuentevilla IA, Bittner M. Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral 2010; 3(3): 118-122.
43. Haffajee, AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000 1994; 5: 78-111.
44. Ardila C, Arbeláez M, Guzmán I. perfil microbiológico subgigival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. Avances en periodoncia e implantología oral 2012; 24(1): 47-53)
45. Font quer, P. Plantas Medicinales (El Dioscórides Renovado). 6ta ed. Barcelona. Labor. 1980.
46. 46 1. Alonso J. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS Ediciones SRL, 1998.
47. Arruda TA. Estudio etnofarmacobotanico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales [Tesis]. Paraíba, Brasil: Universidad Estatal de Paraíba. 2002.
48. Rosúa JL. El complejo *Rosmarinus eriocalyx-tomentosus* en la Península Ibérica. Anales Jard. Bot. 1981; 37: 587 - 595.
49. Muñoz L. Plantas Medicinales Españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Laminiciae) (romero). Stud. bot. 2002; 21:105-118.
50. Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biololgy 1999;37(2):124-30.
51. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) [Tesis].Riobamba, Ecuador. Escuela superior politécnica de Chimborazo. 2010.

52. Avila R, Navarro A, Vera O, Dávila R, Melgoza N, Ramón Meza R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia y Mar 2011;15(43): 23-36.
53. Prakash A, Rao J. Botanical pesticides in agriculture. CRC Press 1997; 461.
54. Musa, O.M., & J.C. Chalchat Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. International Journal of Food Science and Nutrition 2008;59 (7):691-698.
55. Miresmailli S. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. Pest Management Science 2006;62(6): 366-371.
56. Costa ABP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* Revista de Odontologia da UNESP. 2009; 38(2): 111-116)
57. Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. Plant Medicinale 2006;72(15):1378-1382
58. Waggas AM, Balawi EA. Neurophysiological study on possible protective effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves extract in male albino rats treated with acrylamide. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2008; 3(2): 163-171.
59. European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP). Monographs on the medicinal uses of plant drugs. University of Exeter 1997;3.
60. Mudarra S. Valoración cruzada y a doble ciego, mediante el modelo de gingivitis experimental, de la eficacia de tres colutorios de clorhexidina sin alcohol frente a la

- prevención de gingivitis y a la neoformación de placa supragingival [Tesis doctoral]. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. 2003.
61. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999;6(3):437-9.
62. Fordal O, Turnbull R. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. JADA 1986;112: 863-69.
63. Greenstain G, Berman C, Joffin R. Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986;57:370-7.
64. Gjermo P, Bonesvoll P, Rolla G. Relationship between plaque inhibiting effect and retention of clorhexidine in the human oral cavity. Arch Oral Biol 1974;19: 1031-4.
65. Martindale. The Extra pharmacopoeia. 30 Ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993: 781-805.
66. Steenberghe V, Quirynen M, Avontrodt P, Peeters W, Pauwels M, Rouché W. Effect of different clorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. J Clin Periodontol 2001; 11:27-36.

XI. ANEXOS

10.1 Cuadros de consistencia.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *R.officinalis* “romero”

Metabolitos	Reacción	Resultado
Antraquinonas	Bortranger	(-)
Fenoles	Cloruro férrico	(+++)
Flavonoides	Shinoda	(-)
Alcaloides	Dragendorff	(+++)
	Mayer	(+)
	Popoff	(+)
	Bertrand	(+)
	bouchardart	(+)
Taninos	gelatina	(-)
Esteroides	Lieberman-Buchard	(+++)
Saponinas	Espuma	(+++)
Azúcares reductores	Fehling A	(+++)
	Fehling B	(+++)
	Nitrato de plata amoniacal	
Grupo carbonilo		(+++)
Aminoácidos libres	Ninhidrina	(++)

Leyenda:

(+++) Abundante,

(++) Bastante

(+) Regular

(-) No presenta



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

CONSTANCIA N°. 312-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Tallo, con hojas y flor), recibida de **Isabel De María SAN ROMÁN SUÁREZ**, de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Rosmarinus officinalis* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Rosmarinus*

ESPECIE: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre vulgar: "Romero".

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 05 de Noviembre de 2012



Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO DE SAN MARCOS (USM)

10.2 Instrumento de recolección de datos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título: “Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal”

Investigador: San Román Suárez Isabel

Institución: Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos

La información que se describe a continuación, describe la presente investigación y el papel que usted desempeña como participante de la misma.

El presente trabajo de investigación consiste en determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre bacterias de bolsa periodontal en pacientes con enfermedad periodontal, además se comparará la eficacia de este extracto con un antiséptico clorhexidina 0.12 %.

Su participación en este estudio consistirá en donar una muestra el cual será tomado de la encía mediante un filamento de papel estéril el cual luego será colocado en un medio de transporte para su posterior cultivo y exposición a dichas sustancias. Realizándose un procesamiento de los resultados.

Confidencialidad:

La ficha de datos en la cual se identifica a usted y el consentimiento informado que firmó serán revisados por el investigador. Los resultados de esta investigación podrán presentarse para su exposición, sin embargo, su identidad no será divulgada en tales presentaciones.

Consentimiento:

He leído y conversado con el investigador sobre este trabajo de investigación, habiendo entendido doy consentimiento voluntario para participar en la investigación.

_____	_____	Fecha: _____
Nombres y Apellidos	Firma	

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Facultad de odontología

“Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal”

FICHA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA

I. DATOS DEL PACIENTE

- Nombre del paciente:
- Nombre del operador:
- Edad:años

II. ANTECEDENTES

- Presenta enfermedad sistémica: SI ☐ NO ☐
- Presenta medicación antibiótica: SI ☐ NO ☐

III. EXAMEN CLINICO

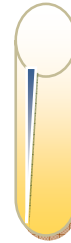
- N° de pieza:
- Profundidad de sondaje:

Observaciones:.....

Cuadros y gráficos

FLUXOGRAMA: Siembra de la muestra

Muestra: cono de papel sumergido en 3 ml de THL,
incubado por 24 h.



A un nivel de turbidez de 0.5 Mc Farland
0.5 ml Suero fisiológico



Siembra por diseminación en

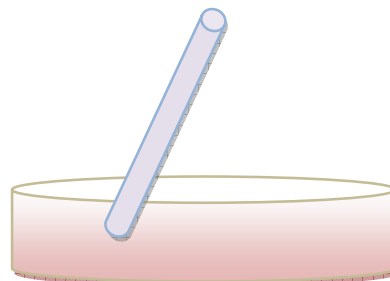
Agar Schaedler

Alícuotas de 100 μ L

Esperar de 3 – 5 minutos para secado



Realizar los pocillos mediante sacabocado.



Llenar los pocillos con las sustancias.

Tiempo: Se coloca en una jarra de anaerobiosis con sobres de un reactivo que absorbe oxígeno y generan dióxido de carbono. Es llevado a incubación por 48 horas a 37 °C

Luego lectura y medición de halos de inhibición.

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

MEDIDA DE HALO DE INHIBICION EN PLACA A. SHADLER

Flora mixta de bolsa periodontal	Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero)			Control positivo clorhexidina	Control negativo agua destilada
	25 mg/ml	50 mg/ml	75 mg/ml		
Cultivo N° 01	8	10	11	11.5	5
Cultivo N° 02	8.5	11.5	15.5	11	5
Cultivo N° 03	9	10.5	12	16	5
Cultivo N° 04	6	9	10	14	5
Cultivo N° 05	9	9.5	11	15	5
Cultivo N° 06	8.5	10.5	12	15	5
Cultivo N° 07	9.5	10.5	12	15	5
Cultivo N° 08	6	10	11	12	5
Cultivo N° 09	11	15	17	14	5
Cultivo N° 10	10	13	14	13	5
Cultivo N° 11	9.5	10	12.5	15	5
Cultivo N° 12	9.5	15	16	14	5
Cultivo N° 13	9	9.5	11	12	5
Cultivo N° 14	10	14	16	13	5
Cultivo N° 15	9	13	17	13.5	5
Cultivo N° 16	10	15	19	16	5
Cultivo N° 17	9.5	12	15	13	5
Cultivo N° 18	9	10.5	14	13	5
Cultivo N° 19	6	8	10.5	12	5
Cultivo N° 20	10	11.5	12	12	5
Cultivo N° 21	9.5	11.5	13	13	5
Cultivo N° 22	10	12	12	12	5
Cultivo N° 23	11.5	12	13.5	13	5
Cultivo N° 24	10.5	11.5	13	13.5	5

10.3 FOTOGRAFIAS



Fig.A



Fig.B

1. Elaboración del extracto etanólico de *R.officinalis*: A. selección de hojas de "romero". B. Maceración en solución hidroalcohólica al 80% de las hojas de "romero"



Fig. A



Fig.B

Fig. A. Materiales y equipo usado para la prueba de actividad antimicrobiana.
Fig.B. Dilución del extracto etanólico: 25mg/ml,, 50mg/ml,, 75mg/ml.



Fig. A



Fig. B

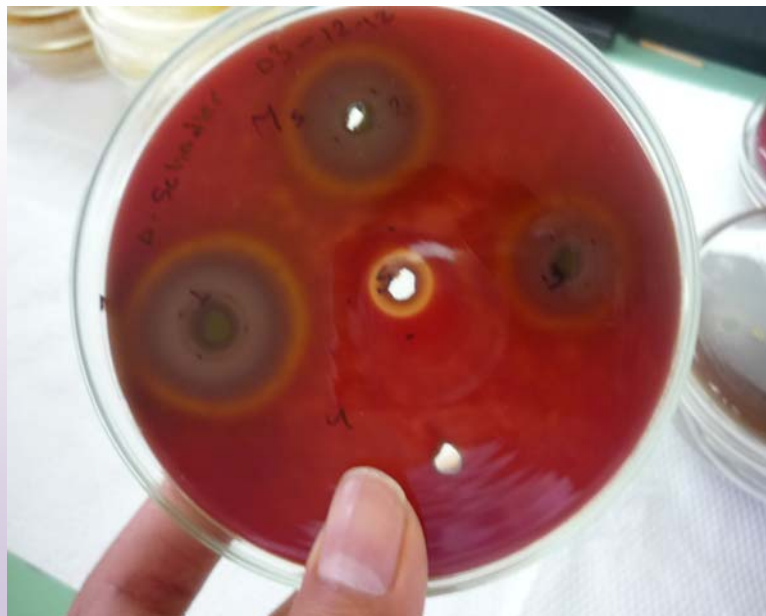
Fig. A. elaboración de pocillos. Fig. B. Llenado de los pocillos con extracto etanólico de romero y los controles.



Colocación de las placas en sobre de anaerobiosis e incubación a 37 durante 48 horas.



Halos de inhibición formados a las 48 horas de incubación.



Halos de inhibición formados a las 48 horas de incubación.



Tallo con hojas y flores de *Rosmarinus officinalis* "romero" de aprox.42 cm.